

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
2 de Octubre de 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/080102 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **A61K 38/08**,
C07K 7/06, A23K 1/165 // C07K 105:00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU03/00002

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de Enero de 2003 (22.01.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2002/0020 24 de Enero de 2002 (24.01.2002) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA. [CU/CU]; Ave.31 e/158 y 190, Cubanacán, Paya., 12100 Ciudad de la Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ESTRADA GARCIA, Mario, Pablo** [CU/CU]; Ave.31 e/158 y 190, Cubanacán, Paya., 12100 Ciudad de la Habana (CU). **MARTINEZ RODRIGUEZ, Rebeca** [CU/CU]; Ave.31 e/158 y 190, Cubanacán, Paya., 10600 Ciudad de la Habana (CU). **ARENAL CRUZ, Amilcar** [CU/CU]; Circunvalación norte, e/ Ave. Finlay y Polígono militar., 70100 Camaguey (CU). **PIMENTEL PEREZ, Rafael, Marcos** [CU/CU]; Circunvalación norte, e/ Ave. Finlay y Polígono militar., 70100 Camaguey (CU). **MORALES ROJAS, Antonio** [CU/CU]; Ave.31 e/158 y 190, Cubanacán, Paya., 10600 Ciudad de la Habana (CU). **PIMENTEL VAZQUEZ, Eulogio** [CU/CU]; Circunvalación norte, e/ Ave. Finlay y Polígono militar., 70100 Camaguey (CU). **ESPINOSA VAZQUEZ, Alexander** [CU/CU]; Jesús María #107, e/ San Martín, y San José., 70100 Camaguey (CU). **GARCIA MOLINA, Carmen**,

Aday [CU/CU]; Circunvalación norte, e/ Ave. Finlay y Polígono militar., 70100 Camaguey (CU). **CABRERA GONZALEZ, Edenaída** [CU/CU]; Circunvalación norte, e/ Ave. Finlay y Polígono militar., 70100 Camaguey (CU). **VINJOY CAMPA, Mirta** [CU/CU]; Calle Alegría e/ Atlanta y Georgia, Arroyo Naranjo., 10900 Ciudad de la Habana (CU). **TOLEDO PEREZ, Sergio** [CU/CU]; San Cristobal #51, e/ Recreo y, Suzarte, Cerro., 12000 Ciudad de la Habana (CU). **CARRILLO FARNES, Olimpia** [CU/CU]; Ave. 45 # 10416 e/ 104 y 106, Marianao., 11400 Ciudad de la Habana (CU). **ZALDIVAR MUÑOZ, Claudina** [CU/CU]; Ave. 47 #1122 e/ 26 y Ulloa, Plaza., 10600 Ciudad de la Habana (CU).

(74) Mandatario: **POVEDA MARCHECO, Argia**; Ave. 31 e/158 y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de la Habana (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF STIMULATING GROWTH AND RESISTANCE TO DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS

(54) Título: METODO PARA LA ESTIMULACION DEL CRECIMIENTO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN ORGANISMOS ACUATICOS

(57) Abstract: The invention is related with the chemical synthesis for increase the growth rate in marketable fish and custratean. The aim of this invention is supply GHRP-6 to induce directly or indirectly the release of growing hormone or like, to produce the increase of circulating growing hormone level in the blood of the fishes. The peptide is stable, soluble and biologically active. The peptide is able to stimulate growth, improve the larvae quality, and increase the defense against pathogen agents, the dry weight, the protein concentration and the RNA in muscle of fish and crustaceans.

(57) Resumen: La invención esta relacionada con la síntesis química con vistas a aumentar la tasa de crecimiento de peces y crustáceos comercializables. El objetivo de la invención es el suministro de GHRP-6 para provocar directa o indirectamente la liberación de hormona de crecimiento o similar y producir el aumento del nivel de hormona de crecimiento que circula en la sangre de los peces. El péptido es estable, soluble y biológicamente activo. El péptido es capaz de estimular el crecimiento, de mejorar la calidad de las larvas y de aumentar las defensas contra agentes patógenos, el peso seco, la concentración de proteínas y el ARN en el músculo de peces y crustáceos.

501/697

24 July 04



WO 03/080102 A1

WO 03/080102 A1



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

Método para la estimulación del crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos.

Sector Técnico

- 5 La invención está relacionada con la aplicación de la síntesis química para incrementar la eficiencia del crecimiento de peces y crustáceos de valor comercial. La síntesis de péptidos análogos del tipo Leu-encefalina y Met-encefalina ha sido reportada y se ha demostrado su capacidad de estimular la liberación de la hormona de crecimiento en mamíferos y aves (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. Endocrinology . 114: 1537-45).

Arte Previo

- 15 Estudios para entender la relación estructura-actividad de péptidos liberadores de la hormona de crecimiento han sido desarrollados en mamíferos y aves, identificándose que el hexámero GHRP-6 ($\text{His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH}_2$), es extremadamente potente y seguro para provocar la liberación de la hormona de crecimiento, incluso en el hombre (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. Endocrinology . 114: 1537-45), sin embargo no existen reportes previos del uso de este compuesto en organismos acuáticos.

- 20 Teniendo en cuenta que no existen evidencias en crustáceos, hasta el presente, de que exista una cascada de señales que intervienen en la estimulación del crecimiento (hipotálamo-hipófisis-órgano blanco), se muestra por primera vez, que el péptido GHRP-6, por si solo es capaz de ejercer una función biológica similar en crustáceos.

- 25 La acuicultura es dominada por la producción de peces de agua dulce; sin embargo desde la pasada década se ha incrementado el aporte de algas marinas, moluscos y crustáceos a la producción global de la acuicultura. Una mejor comprensión de la genética, reproducción, nutrición y fisiología del organismo seleccionado es el primer paso para contribuir en su desarrollo productivo (Gómez-Chiarri M, Smith GJ, de la Fuente J and Powers DA. 1998. In de la Fuente J and Castro FO, editors. Gene transfer in aquatic organisms. Austin, Texas: RG Landes Company and Germany: Springer Verlag; p.107-125).

- 30 El conocimiento de las características moleculares de las hormonas con influencia en el crecimiento de especies marinas de importancia económica puede ser utilizado para alcanzar un mejor comportamiento productivo de estas especies en cultivo.

Como ejemplo de lo anteriormente expresado se puede mencionar el uso de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) y un antagonista del receptor de la dopamina utilizado por Silverstein y colaboradores en 1999 (Silverstein JT., Bosworth BG. and Wolters WR. 1999. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 30, No.2, June, 263 – 268), para regular e inducir la reproducción en pez gato (*Ictalurus punctatus*), especie de gran importancia económica en la acuicultura mundial.

Otro resultado interesante de la utilización de péptidos sintéticos para el aumento de la productividad en animales de granja, fue lo reportado por Hashizune y colaboradores en 1997 (Hashizume T., Sasaki M., Tauchi S. and Masuda H. 1997. Animal Science and Technology. Vol. 68, No.3, March, 247-256) cuando demostraron la inducción de la hormona de crecimiento en cabras por la aplicación de inyecciones con un nuevo péptido sintético liberador de la hormona de crecimiento.

El suministro de hormonas como la insulina ha sido ensayada también en peces de forma oral demostrándose que produce cambios en señales de receptores y hormonas que intervienen en la adaptación de las carpas a diferentes temperatura (Vera MI., Romero F., Figueroa J., Amthauer R., Leon G., Villanueva. and Krauskopf M. 1993. Comp. Biochem. Physiol. Vol.106A, No.4, 677-682)

En mamíferos también se han estudiado otras variantes sintéticas de péptido liberador de hormona de crecimiento, como el reportado en 1995 por Patchett y colaboradores con el péptido MK-0677, designado como potente activador oral de la hormona de crecimiento en perros, sin provocar efectos en los niveles de tirosina y prolactina después de su aplicación (Patchett AA., Nargund RP., Tata JR., Chen MH., Barakat KJ., Johnston DBR., Cheng K., Chan WWS., Butler B., Hickey G., Jacks T., Schleim K., Pong SS., Chaung LYP., Chen HY., Frazier E., Leung KH., Chiu SHL. and Smith RG. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.92, 7001-7005)

También se han ensayado hormonas liberadoras de la hormona de crecimiento en vacas con fines de incremento de la producción de leche, ya que el aumento de los niveles circulantes de GH, estimula entre otras cosas la producción de leche (Soliman EB., Hashizume T., Ohashi S. and Kanematsu S. 1997. Domestic animal endocrinology. Vol.14(1), 39-46)

En peces no existen reportes anteriores de la utilización del péptido GHRP-6, por lo que su utilización para estimular crecimiento, aumentar sobrevida, aumentar la resistencia a agentes patógenos que se reportan en este documento constituyen una gran solución para la potenciación y aumento de la productividad del cultivo de organismos acuáticos.

Aunque se han dado pasos de avance en la domesticación y cruzamiento genético de algunas especies de camarones como son *Penaeus japonicus* y *Litopenaeus vannamei*, no ha existido un progreso suficiente, por la falta de comprensión de los procesos genéticos y bioquímicos de estas especies (Benzie, J.A.H., 1998. *Penaeid genetics and biotechnology*. *Aquaculture* 164, 23–47; Fjalestadl, K.T., Carr, W.H., Lotz, J.L., Sweeney, J.N., 1999. *Aquaculture* 173, 10), por lo que una de las aplicaciones con mayor importancia en los camarones peneidos podría ser la ingeniería genética enfocada al mejoramiento del crecimiento y al aumento de su resistencia a agentes patógenos (Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J. (1995) *Aquaculture*.132, 17-32).

Se concierne en esta invención que el péptido GHRP-6 es capaz por si solo de estimular el crecimiento, mejorar la calidad de las larvas, aumentar las defensas contra agentes patógenos, aumentar el peso seco, concentración de proteínas y ARN en el músculo de peces, crustáceos y moluscos .

15 **Ventajas de la solución propuesta**

En la presente invención se presenta por primera vez la utilización del péptido GHRP-6 para la estimulación del crecimiento y la resistencia a agentes patógenos y otras enfermedades. Se demuestra además que el secretagogo GHRP-6 por si solo estimula el crecimiento en peces y crustáceos mediante la inyección, por la vía oral o por inmersión. Se demuestra además su efecto en la defensa contra agentes patógenos, el incremento del peso seco en el músculo de los organismos acuáticos tratados, el aumento de la concentración de proteínas y ARN en el tejido y el mantenimiento de los eritrocitos como demostración de su inocuidad en tilapia.

Breve Descripción de las Figuras

25 **Figura 1.** Niveles de GH en suero y de ARN mensajero de IGF-I en hígado de tilapias juveniles inyectadas con el secretagogo GHRP-6. Cada grupo de tres animales fue inyectado intraperitonealmente. Muestras de suero y hígado fueron tomadas a los 15, 30, 60 y 360 minutos después de la inyección. Muestras de suero fueron tomadas de cada animal antes de la inyección. * diferencia significativa sobre el grupo control ($p < 0.001$ ANOVA, Duncan test). tiGH: Hormona de crecimiento de tilapia. Las barras indican el error estándar.

Figura 2. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 por vía intraperitoneal y un grupo control durante tres semanas. * t-test $p = 0.029$. Las

barras indican la variación en el peso \pm el error estándar (ES) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos.

Figura 3. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 por vía oral en solución acuosa y su grupo control. La duración del experimento fue de

5 tres semanas. * t-test $p = 0.015$. Las barras indican la variación en el peso (\pm ES) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos (\pm ES)

Figura 4. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 encapsulado por vía oral y su grupo control. La duración del experimento fue de tres semanas. * t-test $p = 0.05$, ** t-test $p=0.007$. Las barras indican la variación en el peso

10 (\pm ES) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos (\pm ES)

Figura 5. Experimento de crecimiento en camarones *Litopenaeus schmitti* tratados con el péptido GHRP-6. A: Perfil de aumento del peso en miligramos de los camarones en los tres grupos tratados con el péptido y el grupo control. B: Perfil de aumento del largo en milímetros de los camarones en los tres grupos tratados con el péptido y el grupo control.

15 C: Distribución de la frecuencia absoluta de las ramificaciones branquiales de tres grupos tratados con el péptido y el grupo control. D: Distribución de la frecuencia absoluta de las modificaciones rostrales de tres grupos tratados con el péptido y el grupo control.

I, II ,III: Grupos tratados con diferentes concentraciones de péptido.

20 Control Grpo tratado con BSA.

*** $p<0.001$. Las barras indican la variación en el peso (\pm DS). ANOVA seguido por un DUNCAN en el caso de la talla y el peso. Kolmogorov-Smmirnov en las ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales.

Figura. 6 Perfil del peso seco en animales tratados con el péptido y controles. *** t-test

25 $p<0.001$. Las barras indican la variación en el peso (\pm DS).

Figura. 7 Relaciones entre RNA, Proteína y DNA. Como se observa en la figura hay diferencias significativas lo que dice de la hipertrofia de estos parámetros en los animales tratados con péptido.*** t-test $p<0.001$. Las barras indican la variación en el peso (\pm DS).

30 Figura 8. Crecimiento neto en condiciones de producción de camarones tratadas con baños de inmersión con el péptido GHRP-6 en su estadio larval y el grupo control con BSA. La duración del experimento fue de seis semanas. *** t-test $p<0.001$. Las barras indican la variación en el peso (\pm DS).

Descripción detallada de la invención

Para demostrar la estimulación del crecimiento, en organismos acuáticos, más específicamente en peces, crustáceos y moluscos, empleando solamente el hexapéptido GHRP-6 "Growth hormone release peptide" de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, primeramente se demostró que en peces era capaz de efectuar una actividad biológica similar a la mostrada en mamíferos y aves (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. Endocrinology . 114: 1537-45).

Para ello se suministraron inyecciones del péptido a tilapias juveniles y se obtuvieron muestras de suero e hígado de las mismas a diferentes tiempos, demostrándose como al igual que en mamíferos y aves, después de la inyección del péptido aumentan los niveles circulantes de la hormona de crecimiento en suero a los 15 minutos y media hora después se observó un aumento del ARN mensajero del IGF-I en hígado (Ejemplo 1).

Teniendo en cuenta que no existen evidencias hasta el presente, de que la cascada de las señales que intervienen en la estimulación del crecimiento, hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (hígado), se conserve exactamente igual en los organismos acuáticos que en mamíferos y aves, se muestra por primera vez que el péptido GHRP-6 por si solo y administrado por diferentes vías es capaz de ejercer su actividad en peces.

Se realizaron experimentos de comparación del crecimiento en tilapias juveniles, administrándole a un grupo experimental el GHRP-6 y al grupo control se le administró solución salina en cada caso en dependencia de la vía de administración. Se utilizaron tres vías de administración: a) Inyección intraperitoneal; b) Oral; c) Inmersión.

En los tres casos se observó un incremento significativo del aumento del peso diario de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 en comparación con su grupo control en cada caso. (Ejemplo 2)

Otro experimento de gran valor para demostrar el efecto del péptido GHRP-6 en peces fue demostrar su aplicabilidad en tilapias de 1 mg de peso por vía de la inmersión y estudiar el efecto que este provocaba en la defensa contra los patógenos y en la calidad de su músculo (Ejemplo 3)

Los resultados muestran que el grupo de tilapias tratadas con el péptido incrementó significativamente su peso, mostró menor índice de intensidad y extensión de la invasión de agentes patógenos que el grupo control y presentó menor contenido de agua en su músculo así como mayor concentración de proteínas lo que sugiere que el aumento de peso provocado por el péptido induce un aumento de la síntesis proteica y no un aumento del contenido de agua en su músculo

El secretagogo GHRP-6 también fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que era capaz por si solo de estimular el crecimiento en crustáceos a partir de su aplicación por varias tres vías de administración: a) Inyección intramuscular; b) Oral; c) Inmersión (Ejemplo 4).

- 5 El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que era capaz de estimular el crecimiento en camarones a partir de su aplicación de 4 baños de inmersión, en diferentes estadios larvales. Al terminar el ciclo de cultivo de las larvas en un centro de desove, los grupos tratados con dosis similares a tilapia presentaban una mayor calidad. Esto estaba evidenciado en un incremento en
- 10 peso, incremento en la talla, un mayor número de pares de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales, un menor contenido de agua en el músculo de los animales y mayor concentración de ARN proteína en el músculo lo que evidenció una mayor actividad metabólica.

- 15 Las larvas tratadas con el péptido y el control fueron sembradas en estanques de tierra para ver su comportamiento productivo. El día de la cosecha de los estanques los animales tratados con el péptido mantuvieron el incremento del peso, de la talla y una mayor homogeneidad en el peso y la talla en este grupo al compararlos con el control.

(Ejemplo 5)

- 20 El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que es capaz de estimular el crecimiento en camarones mediante la inyección intramuscular, en camarones adultos. Al concluir los 15 días del experimento el péptido inyectado estimuló el crecimiento de los individuos entre un 100 - 150 % respecto al control. Con diferencias significativas ($p < 0.001$).

(Ejemplo 6 y 6.1)

- 25 El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que es capaz de estimular el crecimiento en camarones por vía oral, en larvas de camarón. El péptido GHRP-6 incluido en la dieta incrementó el crecimiento de los camarones entre un 30 - 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). El secretagogo GHRP-6 bioencapsulado en *Artemia salina*
- 30 incrementó el crecimiento de los individuos entre un 30 y un 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Demostración de la actividad biológica del GHRP-6 en peces.

Se determinaron los niveles de ARN mensajero del IGF-I en hígado de tilapias inyectadas intraperitonealmente con GHRP-6, así como se monitoreó los niveles de GH en los mismos animales en el tiempo, demostrándose que el GHRP-6 era capaz en peces de estimular la presencia de la GH circulante en sangre y como respuesta a esta de incrementar los niveles del ARN mensajero del IGF-I después de media hora de la inyección del péptido (Figura 1).

Quince tilapias de peso promedio 71 ± 28 g fueron utilizadas para el experimento. El péptido GHRP-6 fue inyectado a una concentración de $0.1 \mu\text{g/gbw}$ (microgramos de péptido por gramo de peso del animal). Las muestras de hígado y sangre se colectaron antes del tratamiento y 15, 30, 60 y 360 minutos después de la inyección del péptido (se utilizaron tres animales en cada tiempo). El suero y la sangre fueron congelados y guardados a -70°C hasta que se fueron utilizados para el ELISA para la cuantificación de la GH circulante o para la extracción del ARN mensajero en el caso del hígado para la cuantificación por Southern blot de los niveles de IGF-I.

El ARN total del hígado de las tilapias utilizadas en el experimento fue purificado según el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi. $20 \mu\text{g}$ de ARN total fueron aplicados y corridos en un gel de agarosa - formaldehído del 1%, finalmente fueron transferidos a una membrana de Nylon (Hybond N, Amersham UK) y hibridadas con una sonda marcada correspondiente al ADN complementario del IGF-I de tilapia (6) y seguidamente re-hibridado con una sonda del gen humano de la gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa (GADPH, gentilmente donado por el Dr. Bryan Williams, Cleveland Foundation, OH, USA), para la normalización de las señales.

Las señales de la hibridación fueron cuantificadas a partir del procesamiento digital de la imagen de la radiografía, utilizando el "Hewlett Packard Scanjet Plus scanner". Las imágenes fueron procesadas con el programa de computación "Bandleader".

Los niveles de GH en el suero de las tilapias inyectadas fueron medidos por un ELISA, utilizando dos anticuerpos monoclonales contra la tiGH (Muñoz y cols, en preparación).

Ejemplo 2. Experimento de crecimiento en tilapias juveniles tratadas con GHRP-6

2.1 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas con GHRP-6 por vía intraperitoneal (ip)

El péptido GHRP-6 (BACHEM, Suiza) fue diluido en solución tampón de fosfato de sodio (PBS) e inyectado dos veces a la semana durante tres semanas a $0.1 \mu\text{g}$ de péptido/ g

de peso húmedo de cada pez (gbw). El péptido fue aplicado a un grupo de 8 tilapias machos con peso promedio de 61.41 ± 14.36 g y se utilizó un grupo control de 7 tilapias machos con peso promedio de 61.58 ± 29.67 g el cual recibió PBS. Se midió el peso promedio cada semana (Figura 1). Todos los animales del experimento fueron marcados con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.).

2.2 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas con GHRP-6 por vía oral

Para la administración por vía oral del péptido GHRP-6 se realizaron dos experimentos. El primero administrando el péptido en forma líquida disuelto en PBS y el segundo administrando el péptido en forma de pequeñas perlas encapsulado en alginato de calcio según el protocolo previamente publicado por Knorr y colaboradores en 1988. (Figuras 2 y 3 respectivamente) En ambos experimentos se utilizaron grupos controles a los cuales se le administró solución salina y en todos los casos se utilizaron tilapias entubadas hasta la cavidad faríngea.

2.2.1 Péptido en solución acuosa

El péptido GHRP-6 (BACHEM, Suiza) fue diluido en PBS y administrado vía oral a través de un tubo plástico hasta la cavidad faríngea a un grupo de 7 tilapias machos que tenían un peso promedio de 84.66 ± 12.2 g. Se tomó un grupo control de 7 tilapias machos con peso promedio de 86.38 ± 6.26 g, al cual se le suministró PBS en las mismas condiciones que al grupo tratado con el péptido. El tratamiento se realizó dos veces por semana, durante tres semanas, administrándole una dosis de $0.1 \mu\text{g}$ de péptido/g de peso húmedo de cada pez (gbw) Se midió el peso promedio cada semana (Figura 2). Todos los animales del experimento fueron marcados con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.).

2.2.2 Péptido encapsulado

Para la encapsulación del péptido se obtuvieron las cápsulas según lo reportado por Knorr y colaboradores en 1988. El hexapéptido encapsulado fue administrado a través de un tubo plástico a la cavidad faríngea a siete tilapias con un peso promedio de 89.09 ± 8.38 g. Perlas de polímero sin el péptido GHRP-6 fueron suministrados por la misma vía al grupo control consistente en siete tilapias machos de peso promedio de 89.86 ± 13.54 g. El tratamiento se realizó dos veces por semana durante tres semanas administrando en cada ocasión $0.1 \mu\text{g/gbw}$.

Ejemplo 3. Estimulación del crecimiento en tilapias (*Oreochromis sp*) mediante el péptido GHRP-6 vía inmersión

Se realizó la evaluación del crecimiento en tilapia *Oreochromis sp.* de 1.5g utilizando el péptido GHRP-6 en dosis de 10 mg/100ml y de 100 mg/100ml, también se determinó el valor de hematocrito para tener una idea sobre el estado de la bioquímica sanguínea en los animales tratados con respecto a los controles.

En este mismo experimento se estudió la presencia de Trichodinicos y helmintos mongeneos en los animales utilizados en el ensayo, para observar y comparar la intensidad y la extensión de la invasión de estos agentes patógenos en los grupos tratados.

Por último se realizó un estudio de la concentración de proteína y del porcentaje de humedad en el músculo de las tilapias estudiadas.

Tres grupos con tres réplicas de 15 animales de un mismo desove, con un promedio de peso inicial de 1g fueron escogidos para el ensayo, para lo cual se utilizaron 9 tanques de 40L. Todos los animales se trataron con el péptido vía inmersión una vez por semana durante 15 minutos por 45 días y el grupo control recibió la misma manipulación y la inmersión se les realizó en solución salina.

Los grupos y tratamientos se distribuyeron de la siguiente forma:

Grupo 1 10 µg/100ml (Tratamiento 1)

Grupo 2 100 µg /100ml (Tratamiento 2)

Grupo 3 Control negativo (Solución salina)

Tabla 1. Estudio del peso. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamientos	n	Media del peso (g) ± DS	Comparación entre grupos	Diferencia
Grupo I 10 µg/100 mL	25	4.56±1.07	I-II	0.01454
Grupo II 100µg /100 mL	25	4.54±1.38	II-III	1.07177*
Grupo III Solución salina	25	3.47±1.52	III-I	1.08632*

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras

Tabla 2. Estudio de los valores del Hematocrito. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamientos	n	Media del hematocrito \pm DS	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 μ g /100 mL	15	27.46 \pm 4.53	I-II	(2.4)*
Grupo II 100 μ g /100 mL	15	25.06 \pm 5.25	II-III	(1.0)*
Grupo III Solución salina	15	26.46 \pm 4.08	III-I	(1.4)*

5 *No hay diferencias significativas entre los grupos. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras

10 Tabla 3. Resultados de la intensidad de la invasión (I) y la extensión dela invasión (E) en los organismos tratados, para el protozoo cutáneo *Trichodina sp.* Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	I ^a	E (%) ^b	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 μ g /100 mL	25	7.73	100	I-II	(4.42)
Grupo II 100 μ g /100 mL	25	2.80	84.6	II-III	(5.84)*
Grupo III Solución salina	25	8.76	92.30	III-I	(1.42)

^aI: Intensidad de la invasión

^bE: Extensión de la invasión

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras

- 5 Tabla 4. Resultados de la intensidad de la invasión (I) y la extensión de la invasión (E) en los organismos tratados según los valores del conteo de Helmintos monogeneos encontrados en las branquias de cada pez. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	I ^a	E (%) ^b	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	25	0.39	34.7	I-II	(0.304)
Grupo II 100µg /100 mL	25	0.66	50	II-III	(0.521)
Grupo III Solución salina	25	1.07	46	III-I	(0.826)*

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras

- 10 Tabla 5. Valores del porciento de humedad en el tejido muscular. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	Media de la humedad ± DE (%)	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	24	82.96±3.63	I-II	(0.791)
Grupo II 100µg /100 mL	24	83.5±3.31	II-III	(2.666)*
Grupo III Solución salina	24	86.42±3.23	III-I	(3.458)

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras.
DE: desviación estándar.

- 15 Tabla 6. Valores de la concentración de proteínas en el tejido muscular. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días

Tratamiento	n	Media de la concentración de proteínas ± DE	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	23	6.10	I-II	(1.160)*
Grupo II 100µg /100 mL	23	4.94	II-III	(1.38)*
Grupo III Solución salina	23	3.55	III-I	(2.64)*

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras.
DE: desviación estándar.

Ejemplo 4. Experimento de crecimiento en camarones *Litopenaeus schmitti* por baños de inmersión con el péptido GHRP-6.

- Se tomaron cuatro grupos de larvas camarones se les aplicaron cuatro baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración con diferentes concentraciones del péptido GHRP-6 a tres de ellos y un grupo se tomo como control. Las concentraciones del péptido utilizadas fueron: 0.001, 0.01 y 0.1 mg/L, en los grupos I, II y III respectivamente, al grupo control se le dio la misma frecuencia de baños de inmersión con BSA a 1 mg/L.
- Como resultado se observó que el grupo tratado con la mayor concentración de péptido 0.1 mg/L, se mejoraba la calidad de las larvas de los camarones *Litopenaeus schmitti*. Esto estaba evidenciado en un incremento en peso del 125-153 %, de un 15-26% de incremento en la talla, un mayor número de pares de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales para cada parámetro se realizó el test estadístico correspondiente encontrándose en todos los casos diferencias altamente significativas (Figura 5). Además se encontró que los animales tratados con GHRP-6 presentaban menor contenido de agua en el músculo y mayores valores de las relaciones RNA/DNA, Proteína/DNA, dando idea de lo activado del metabolismo del músculo de estas larvas (Figura 6 y 7).
- Estos resultados son de gran importancia ya que al acelerar el crecimiento del camarón en los estadios iniciales de su vida, provoca una mayor sobrevida en la fase del cultivo lo que es vital para aumentar la productividad de este crustáceo de tanto valor comercial en el mundo.
- La idea anterior fue corroborada en condiciones de producción en un aumento de la sobrevivencia del 20% en los animales tratados con GHRP-6 comparado con sus hermanos controles, además manteniéndose una estimulación del 115% en el peso y de un 37% en la talla, mostrando los animales tratados con el péptido mayor homogeneidad en la talla que sus hermanos no tratados reflejándose en que el coeficiente de variación de solo 24% y 9% en el peso y la talla respectivamente en animales tratados con el péptido a diferencia del 77% y 30% que se observa en el peso y la talla en los animales hermanos (Figura. 8).

Ejemplo 5 Estimulación del crecimiento en camarones mediante la Inyección intramuscular en animales de 15 g

- Las inyecciones de 50 microL del péptido GHRP-6 fueron hechas entre el primer y segundo segmento abdominal usando una jeringuilla de insulina. Las inyecciones se

realizaron 1 vez cada 3 días usando 1 microg/g de peso del péptido GHRP-6. El grupo control fue inyectado con 1 microg/g de peso de BSA. Se usaron 15 animales por cada grupo. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del carapacho con un pie de rey y pesadas en una pesa de 0.1 g de error. Los animales se ubicaron en
5 bolsas de nylon (0.8 cm de luz de malla) con dimensiones de 2 x 2 x 1 (largo x ancho x altura) en un estanque de tierra con una salinidad de 30 g·L⁻¹, 25 C y fotoperíodo natural. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del carapacho de pie de rey y pesadas en una pesa de 0.1g de error.

La GHRP-6 inyectada a las diferentes concentraciones incrementó el crecimiento de los
10 individuos entre un 100 - 150 % respecto al control. Con diferencias significativas ($p < 0.001$).

Ejemplo 6 Estimulación del crecimiento en camarones mediante la inclusión en la dieta

El péptido GHRP-6 fue incluido en una dieta para postlarvas de crustáceos al 1%. El péptido GHRP-6 incluido en la dieta fue microencapsulado por un método de
15 coacervación compleja (Knorr D. and M.Daly. (1988). Process Biochemistry; 48-50). Posteriormente se alimentaron postlarvas de *Litopenaeus schmitti* con la dieta mencionada, así como un control con BSA incluido en el pienso. El efecto de tiGH fue estimado midiendo la longitud del carapacho de las larvas y postlarvas con un micrómetro óptico y pesadas en una pesa de 0.1 mg de error.

20 El péptido GHRP-6 incluido en la dieta incrementó el crecimiento de los camarones entre un 30 - 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

6.1. Encapsulación en artemia

El péptido GHRP-6 fue bioencapsulada en *Artemia* con las que fueron alimentadas las postlarvas de *Litopenaeus schmitti* y *Litopenaeus vanamei*. Para bioencapsular el péptido
25 GHRP-6 en la *Artemia salina*, se le adicionó a una concentración de 10 mg/L durante 1 hora y se cosecharon y lavaron. Posteriormente se alimentaron las postlarvas de *Litopenaeus schmitti* con esta *Artemia* cuatro veces al día durante un mes de experimentación. El grupo control fue alimentado con *Artemia salina* con BSA bioencapsulada. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del
30 carapacho de las larvas y postlarvas con un micrometro óptico y pesadas en una pesa de 0.01 mg de error.

El péptido GHRP-6 bioencapsulado en *Artemia salina* incrementó el crecimiento de los individuos entre un 30 y un 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

Ejemplo 7. Experimento de crecimiento en larvas de salmónes (salmon salar) por baños de inmersión con el péptido GHRP-6

- 5 Se tomaron tres grupos de larvas de salmónes (salmón salar) y se les aplicaron seis baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración con diferentes concentraciones del péptido GHRP-6 a dos de ellos y un grupo se tomo como control. Las concentraciones del péptido utilizadas fueron: 0.01 y 0.1 mg/L, en los grupos I y II respectivamente, al grupo control se le dio la misma frecuencia de baños de inmersión
10 con BSA a 1 mg/L.

- Como resultado se observó, que en el grupo tratado con la mayor concentración de péptido 0.1 mg/L, se incrementó en peso del 120-145 %, tomando como referencia 100% del grupo control y se observó un incremento de un 15-26% de incremento en la talla con respecto al grupo control. Por otra parte se encontró que los animales tratados con
15 GHRP-6 presentaban menor contenido de agua en el músculo, incremento en los valores de las relaciones RNA/DNA, Proteína/DNA, dando idea de la activación del metabolismo en los músculo de estas larvas.

- Estos resultados son de gran importancia ya que al acelerar el crecimiento de las larvas de salmónes en los estadios larvales, provoca una mayor sobrevida en esta fase del cultivo lo que es vital para aumentar la productividad de esta especie tan importante en el
20 comercio de peces en el mundo.

Ejemplo 8. Efectividad del péptido GHRP-6 sobre el ectoparásito "sea lice" *Caligus sp.* en truchas (*Oncorhynchus mykiss*).

- Truchas tratadas en sus estadios larvales mediante baños de inmersión dados cada tres
25 días, en un total de 6 baños, con el péptido GHRP-6 a concentraciones de 0.01 mg/L, 0.1 mg/L y un grupo control, fueron puestos en jaulas de ceba en una región afectada por el ectoparásito *Caligus sp.* De cada jaula se muestrearon cinco veces 20 peces a intervalos de una semana. Ambos grupos tratados en sus estadios larvales con el péptido GHRP-6 redujeron significativamente ($p < 0.05$) la carga de chalimus y *Caligus* (dos tipos
30 importantes de "sea lice") adultos en relación con el grupo control, no existiendo diferencia entre los grupos tratados.

REIVINDICACIONES**MÉTODO PARA LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN ORGANISMOS ACUÁTICOS.**

5

1. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos caracterizado porque se emplea el péptido GHRP-6 de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂.
2. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en
10 organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido GHRP-6 es añadido en formulaciones de pienso para la alimentación de estas especies a una concentración entre 0.01 – 50 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal.
3. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido GHRP-6
15 es suministrado en inyecciones periódicas con intervalos entre 1 y 7 días, a una concentración entre 0.05 – 10 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal.
4. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el péptido en baños de inmersión a concentraciones entre 10 – 500 µg de péptido por litro,
20 con intervalos entre 1 y 7 días, en agua dulce o salada.
5. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el péptido encapsulado por vía oral a una concentración entre 0.05 – 10 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal con intervalos entre 1 y 7 días.
256. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en la tilapia *Oreochromis sp.*
7. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en *Salmon sp.*
8. Un método según la reivindicación 8 caracterizado porque se emplea en camarones
30 de las especies *Litopenaeus schmitti* y *Litopenaeus vanamei*
9. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en *Penaeus sp.*
10. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 9 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias y otras
35 enfermedades.

11. Un método según la reivindicación 10 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por *Trichodina* sp. y Helmintos monogeneos.
12. Un método según la reivindicación 12 caracterizado porque se emplea en el
5 tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por sealice.
13. Un método según la reivindicación 10 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por ectoparásitos.
14. Una formulación veterinaria para estimular el crecimiento y la resistencia a
10 enfermedades en peces y crustáceos caracterizada porque comprende el péptido GHRP-6 de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys -NH₂.
15. Una formulación según la reivindicación 27 caracterizada porque puede emplearse en forma inyectable, oral o por inmersión.

15

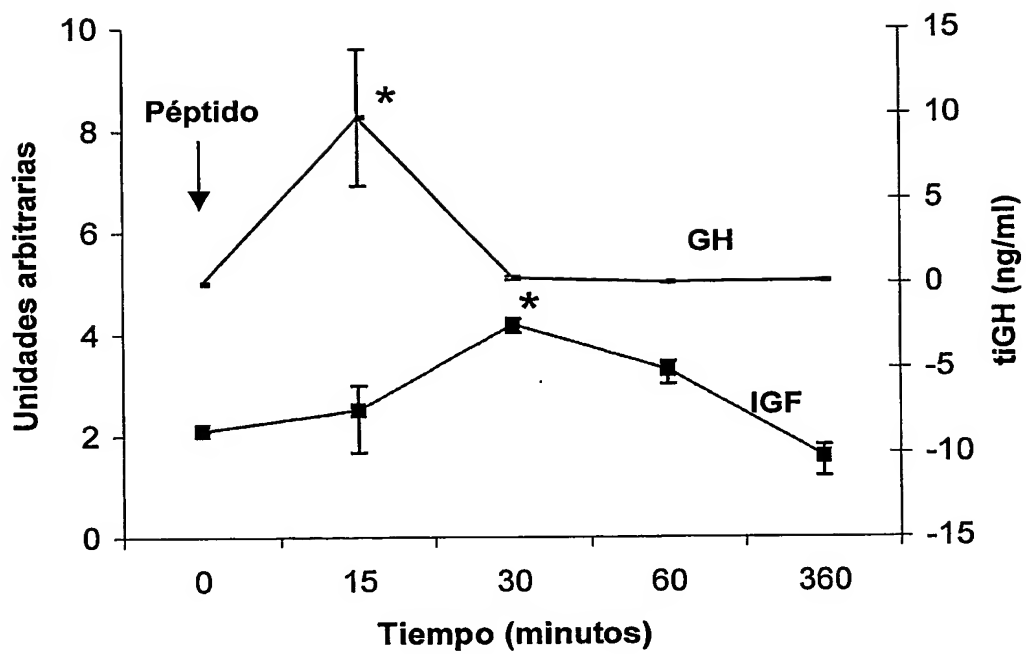
20

25

30

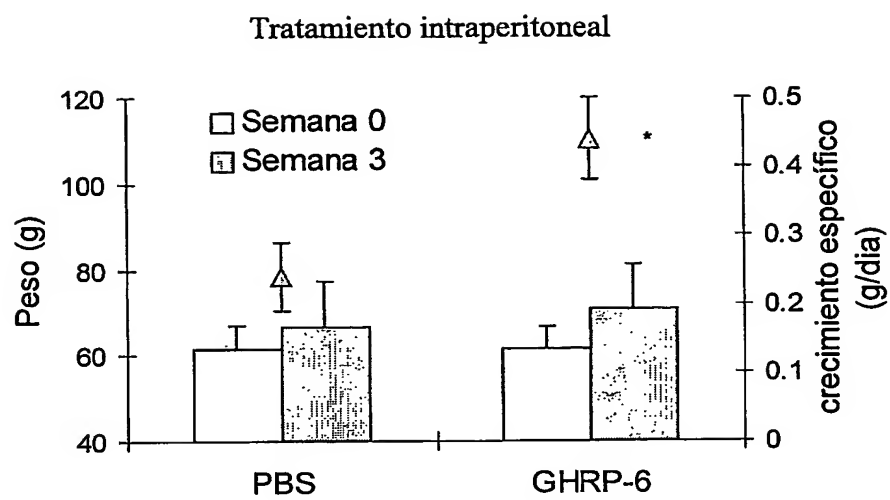
1/8

Figura 1



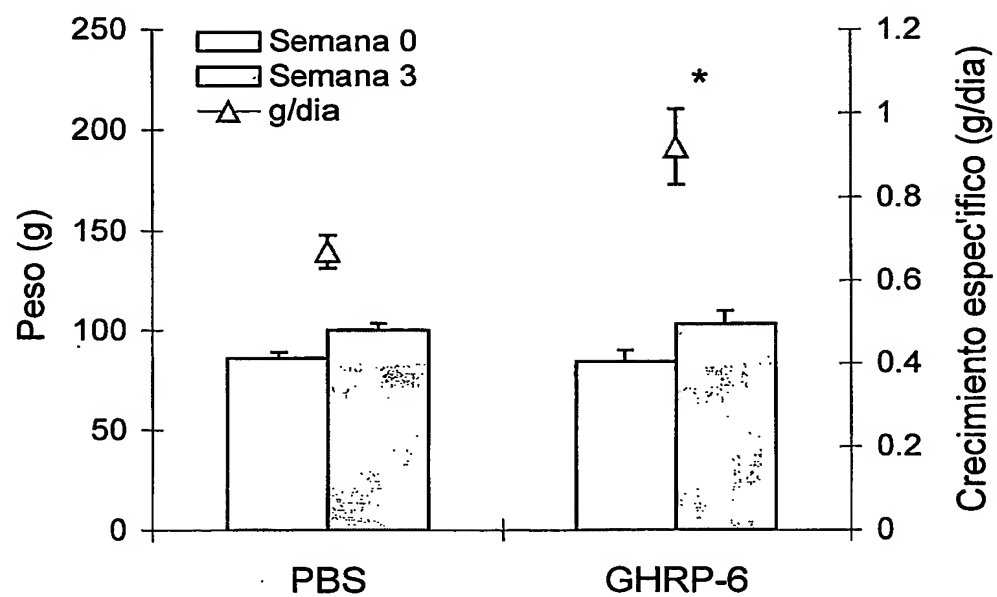
2/8

Figura 2



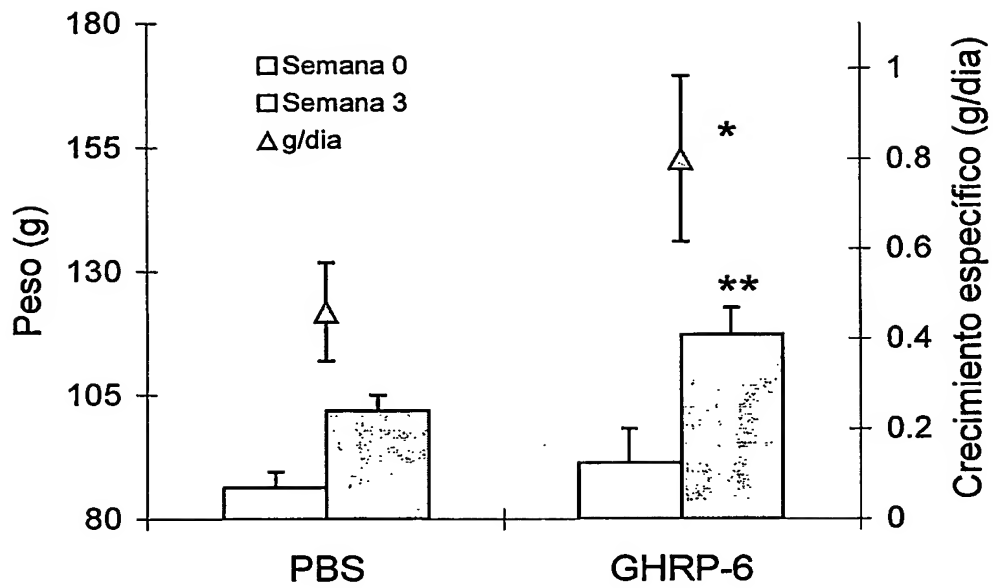
3/8

Figura 3



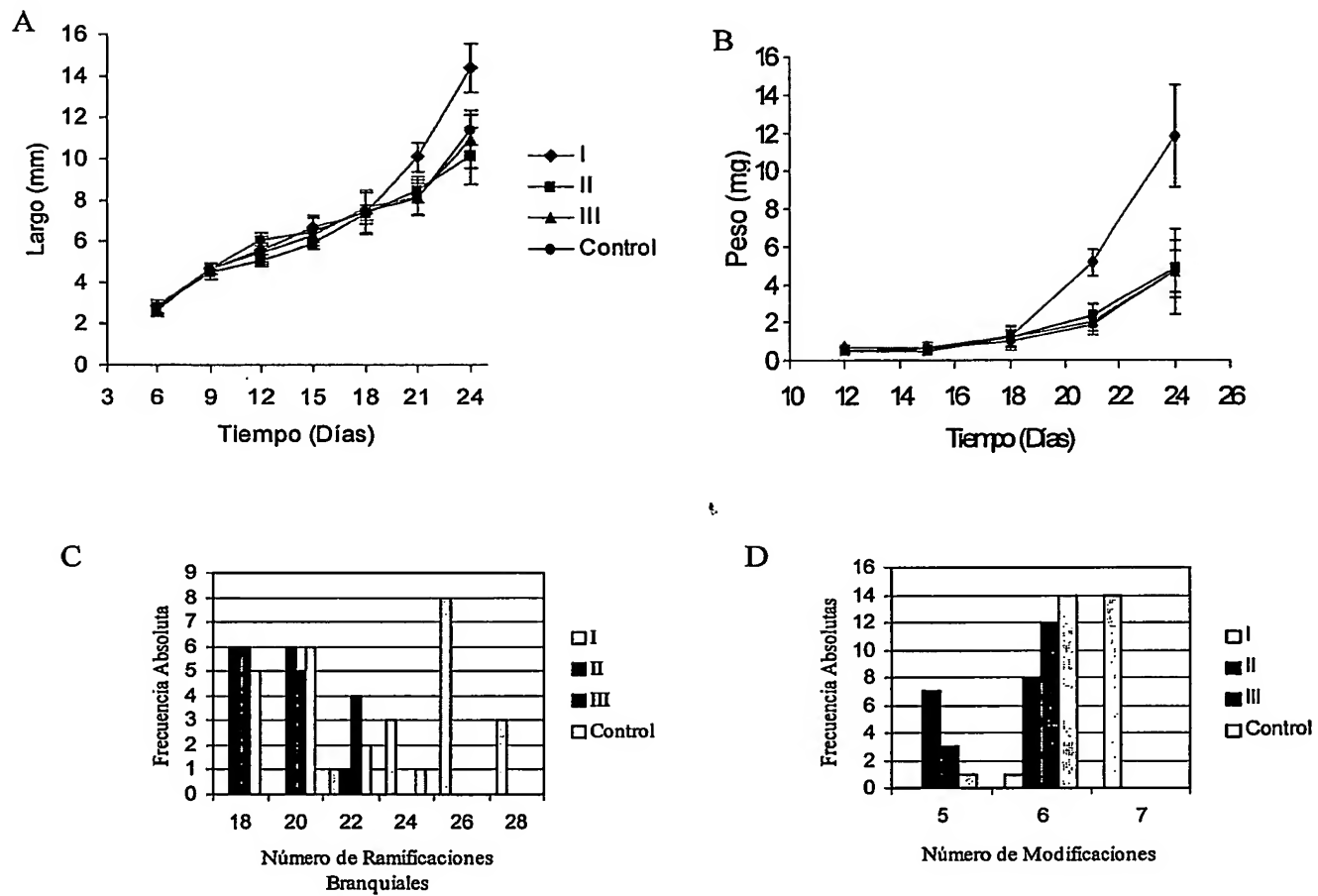
4/8

Figura 4



5/8

Figura 5



6/8

Figura 6

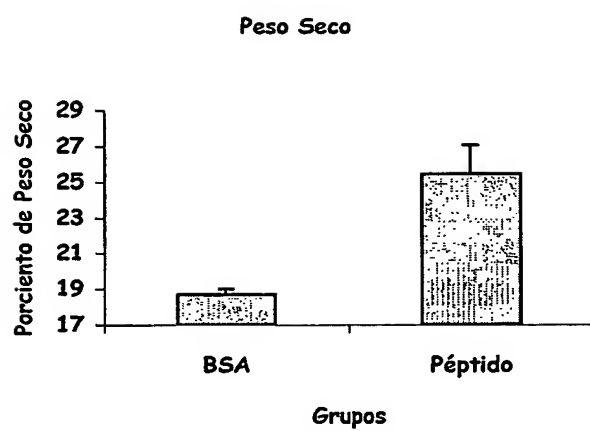


Figura 7

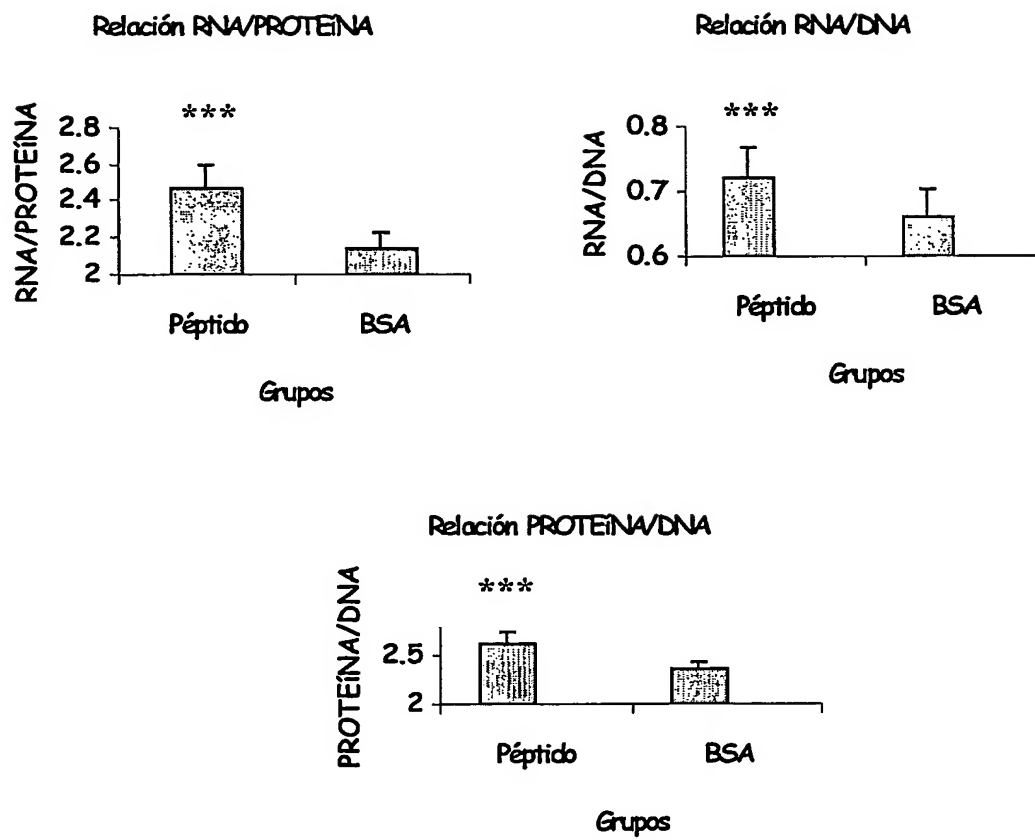
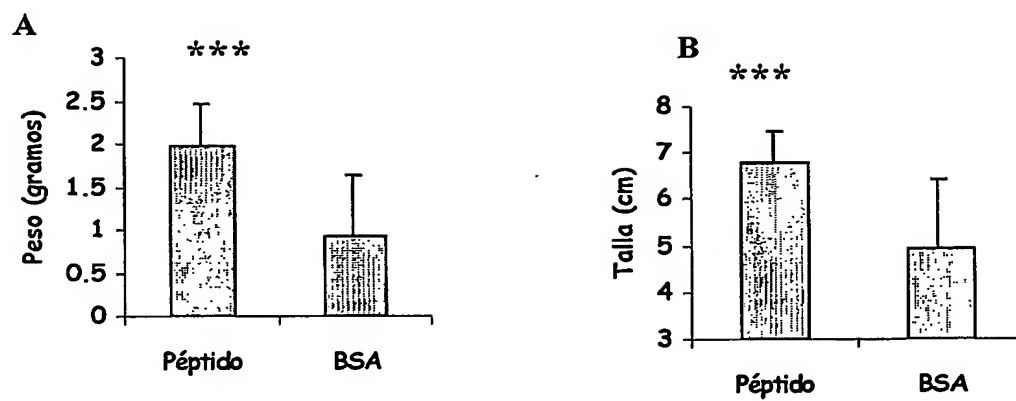


Figura 8



LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
<120> MÉTODO PARA LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y
RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN ORGANISMOS ACUÁTICOS
<130> organismos acauticos
<140>
<141>
<150> CU 2002-0020
<151> 2002-01-24
<160> 1
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(6)
<223> GHRP6
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: GHRP-6
<400> 1
His D-Trp Ala Trp D-Phe Lys
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU 03/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/08 C07K7/06 A23K1/165 //C07K105:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ES 2 005 224 A (EASTMAN KODAK CO) 1 March 1989 (1989-03-01) page 2, line 60 - line 63 page 3 page 6, line 28 - line 29 page 6, line 43 page 7, line 6 - line 7 page 12, line 47 - line 59 page 14, line 39 - line 40 page 14, line 55 page 15, line 19 - line 20; claim 1	1,14
A	--- -/--	3,6-9,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 May 2003

Date of mailing of the international search report

20. 06. 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

RELAÑO REYES, EVA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU 03/00002

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 767 124 A (KAUFMAN MICHAEL J ET AL) 16 June 1998 (1998-06-16) column 16, line 25 - line 31 column 16, line 34 - line 35 column 17, line 6	1,14
A	---	10
A	US 4 411 890 A (MOMANY FRANK A) 25 October 1983 (1983-10-25) column 13, line 5 - line 32 column 17 -column 19 column 20, line 1 - line 10; example 37 -----	1-3,5, 14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU 03/00002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2005224	A	01-03-1989	US 4880778 A	14-11-1989
			AT 79546 T	15-09-1992
			AU 600952 B2	30-08-1990
			AU 7433287 A	01-12-1987
			CA 1309019 A1	20-10-1992
			DE 3781275 D1	24-09-1992
			DE 3781275 T2	07-01-1993
			DK 9888 A	11-01-1988
			EP 0305401 A1	08-03-1989
			ES 2005224 A6	01-03-1989
			IE 60976 B1	07-09-1994
			JP 1502586 T	07-09-1989
			NO 880090 A ,B,	11-01-1988
			NZ 220257 A	29-01-1990
			RU 2062618 C1	27-06-1996
			WO 8706835 A1	19-11-1987

US 5767124	A	16-06-1998	AU 707946 B2	22-07-1999
			AU 7468696 A	15-05-1997
			BG 102476 A	30-04-1999
			BR 9611229 A	25-05-1999
			CN 1205703 A ,B	20-01-1999
			CZ 9801280 A3	16-09-1998
			EA 528 B1	28-10-1999
			EE 9800147 A	15-12-1998
			EP 1019402 A1	19-07-2000
			HK 1017894 A1	28-09-2001
			HU 9902208 A2	28-10-1999
			JP 10512295 T	24-11-1998
			JP 3204266 B2	04-09-2001
			NO 981867 A	29-06-1998
			NZ 321370 A	29-11-1999
			PL 327511 A1	21-12-1998
			SK 51398 A3	02-12-1998
			TR 9800726 T2	21-08-1998
			WO 9715574 A1	01-05-1997
			ZA 9608989 A	29-04-1997

US 4411890	A	25-10-1983	AU 549053 B2	09-01-1986
			BR 8208035 A	22-11-1983
			CA 1242435 A1	27-09-1988
			CA 1317069 A2	27-04-1993
			DE 3276319 D1	19-06-1987
			DK 114192 A	16-09-1992
			DK 390883 A	26-08-1983
			EP 0083864 A2	20-07-1983
			FI 833057 A ,B,	26-08-1983
			IE 54515 B1	08-11-1989
			IL 67577 A	31-07-1988
			IL 82215 A	31-07-1988
			JP 58501861 T	04-11-1983
			KR 8902760 B1	27-07-1989
			KR 9002681 B1	23-04-1990
			MX 9203562 A1	01-09-1992
			NZ 218384 A	06-01-1989
			PH 21326 A	13-10-1987
			PT 76041 A ,B	01-01-1983
			WO 8302272 A1	07-07-1983

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 03/00002

A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 7 A61K38/08 C07K7/06 A23K1/165 //C07K105:00

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 A61K C07K A23K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	ES 2 005 224 A (EASTMAN KODAK CO) 1 Marzo 1989 (1989-03-01) página 2, línea 60 - línea 63 página 3 página 6, línea 28 - línea 29 página 6, línea 43 página 7, línea 6 - línea 7 página 12, línea 47 - línea 59 página 14, línea 39 - línea 40 página 14, línea 55 página 15, línea 19 - línea 20; reivindicación 1	1,14
A	---	3,6-9,15
	-/--	



En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales



Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

21 Mayo 2003

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

20. 06. 2003

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

RELAÑO REYES, EVA

INFORME DE BÚSCADA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00002

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	US 5 767 124 A (KAUFMAN MICHAEL J ET AL) 16 Junio 1998 (1998-06-16) columna 16, línea 25 - línea 31 columna 16, línea 34 - línea 35 columna 17, línea 6	1,14
A	---	10
A	US 4 411 890 A (MOMANY FRANK A) 25 Octubre 1983 (1983-10-25) columna 13, línea 5 - línea 32 columna 17 -columna 19 columna 20, línea 1 - línea 10; ejemplo 37 -----	1-3,5, 14,15

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 03/00002

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2005224 A	01-03-1989	US 4880778 A	14-11-1989
		AT 79546 T	15-09-1992
		AU 600952 B2	30-08-1990
		AU 7433287 A	01-12-1987
		CA 1309019 A1	20-10-1992
		DE 3781275 D1	24-09-1992
		DE 3781275 T2	07-01-1993
		DK 9888 A	11-01-1988
		EP 0305401 A1	08-03-1989
		ES 2005224 A6	01-03-1989
		IE 60976 B1	07-09-1994
		JP 1502586 T	07-09-1989
		NO 880090 A ,B,	11-01-1988
		NZ 220257 A	29-01-1990
		RU 2062618 C1	27-06-1996
		WO 8706835 A1	19-11-1987
US 5767124 A	16-06-1998	AU 707946 B2	22-07-1999
		AU 7468696 A	15-05-1997
		BG 102476 A	30-04-1999
		BR 9611229 A	25-05-1999
		CN 1205703 A ,B	20-01-1999
		CZ 9801280 A3	16-09-1998
		EA 528 B1	28-10-1999
		EE 9800147 A	15-12-1998
		EP 1019402 A1	19-07-2000
		HK 1017894 A1	28-09-2001
		HU 9902208 A2	28-10-1999
		JP 10512295 T	24-11-1998
		JP 3204266 B2	04-09-2001
		NO 981867 A	29-06-1998
		NZ 321370 A	29-11-1999
		PL 327511 A1	21-12-1998
		SK 51398 A3	02-12-1998
		TR 9800726 T2	21-08-1998
		WO 9715574 A1	01-05-1997
		ZA 9608989 A	29-04-1997
US 4411890 A	25-10-1983	AU 549053 B2	09-01-1986
		BR 8208035 A	22-11-1983
		CA 1242435 A1	27-09-1988
		CA 1317069 A2	27-04-1993
		DE 3276319 D1	19-06-1987
		DK 114192 A	16-09-1992
		DK 390883 A	26-08-1983
		EP 0083864 A2	20-07-1983
		FI 833057 A ,B,	26-08-1983
		IE 54515 B1	08-11-1989
		IL 67577 A	31-07-1988
		IL 82215 A	31-07-1988
		JP 58501861 T	04-11-1983
		KR 8902760 B1	27-07-1989
		KR 9002681 B1	23-04-1990
		MX 9203562 A1	01-09-1992
		NZ 218384 A	06-01-1989
		PH 21326 A	13-10-1987
		PT 76041 A ,B	01-01-1983
		WO 8302272 A1	07-07-1983